

RECOMBINANT HUMAN ADF**Publication number:** JP1085097**Publication date:** 1989-03-30**Inventor:** YODOI JIYUNJI; TAGAYA ATSUSHI; MAEDA MICHIIYUKI; MATSUI YUTAKA; KONDO NOBUO; HAMURO JUNJI**Applicant:** AJINOMOTO KK; YODOI JIYUNJI**Classification:****- international:** C12N1/16; A61K38/00; A61P35/00; A61P37/04; C07K1/20; C07K14/00; C07K14/52; C07K14/54; C12N1/20; C12N5/10; C12N9/02; C12N15/09; C12P21/02; C12R1/19; C12R1/865; C12R1/91; C12N1/16; A61K38/00; A61P35/00; A61P37/00; C07K1/00; C07K14/00; C07K14/435; C12N1/20; C12N5/10; C12N9/02; C12N15/09; C12P21/02; A61K38/00; (IPC1-7): A61K37/02; C07K13/00; C12N1/16; C12N1/20; C12N5/00; C12N15/00; C12P21/02**- European:** C12N9/02D**Application number:** JP19880134218 19880531**Priority number(s):** JP19870146348 19870612**Also published as:**

EP0299206 (A)

EP0299206 (A)

EP0299206 (B)

Report a data error here**Abstract of JP1085097**

PURPOSE:To produce recombinant human ADF polypeptide by culturing procaryotic or eucaryotic cells transformed with the plasmid containing human ADF- coding gene. **CONSTITUTION:**Procaryotic cells such as Escherichia coli or eucaryotic cells such as Saccharomyces cerevisiae, monkey COS cells are transformed with the plasmid containing the gene coding human ADF (adult T-cell leukemia factor). Then the transformed cells are cultured in a usual manner and the recombinant ADF polypeptide or methionin-added ADF polypeptide on its N-terminal is collected from the cultured cells.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP) ⑪ 特許出願公開
⑫ 公開特許公報(A) 昭64-85097

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和64年(1989)3月30日
C 12 P 21/02 H-6712-4B
C 07 K 13/00 8318-4H
C 12 N 1/16 K-7235-4B※
審査請求 未請求 請求項の数 12 (全21頁)

⑮ 発明の名称 リコンビナント ヒトADF

⑯ 特 願 昭63-134218

⑰ 出 願 昭63(1988)5月31日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)6月12日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-146348

㉑ 発 明 者 淀 井 淳 司 京都府京都市左京区北白川西瀬ノ内町39

㉒ 発 明 者 多 賀 谷 温 大阪府枚方市宇山町14-11

㉓ 発 明 者 前 田 道 之 京都府京都市左京区高野東開町1-19

㉔ 発 明 者 松 井 裕 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

㉕ 発 明 者 近 藤 信 雄 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

㉖ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

㉗ 出 願 人 淀 井 淳 司 京都府京都市左京区北白川西瀬ノ内町39

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

リコンビナント ヒトADF

2. 特許請求の範囲

(1) 下記のアミノ酸配列(I)を有するリコンビナントヒト成人T細胞白血病由来因子(以下ヒトADFと称する。)ポリペプチド。

アミノ酸配列(I):

1
Val-Lys-Gln-Ile-Glu-Ser-Lys-Thr-Ala-Phe-Gln-
Glu-Ala-Leu-Asp-Ala-Ala-Gly-Asp-Lys-Leu-Val-
Val-Val-Asp-Phe-Ser-Ala-Thr-Trp-Cys-Gly-Pro-
Cys-Lys-Met-Ile-Lys-Pro-Phe-Phe-His-Ser-Leu-
Ser-Glu-Lys-Tyr-Ser-Asn-Val-Ile-Phe-Leu-Glu-
Val-Asp-Val-Asp-Asp-Cys-Gln-Asp-Val-Ala-Ser-
Glu-Cys-Glu-Val-Lys-Cys-Met-Pro-Thr-Phe-Gln-
Phe-Phe-Lys-Lys-Gly-Gln-Lys-Val-Gly-Glu-Phe-
Ser-Gly-Ala-Asn-Lys-Glu-Lys-Leu-Glu-Ala-Thr-
100
Ile-Asn-Glu-Leu-Val

(2) 請求項(1)記載のヒトADFポリペプチドのN
末端にMetが付加されたものであるリコンビナ

ントヒトADFポリペプチド。

(3) 請求項(1)記載のヒトADFポリペプチドをコ
ードする遺伝子。

(4) 請求項(2)記載のヒトADFポリペプチドをコ
ードする遺伝子。

(5) 遺伝子が下記塩基配列(a)を有する請求項
(3)記載の遺伝子。

塩基配列(a):

1
GTGAAGC AGATCGAGAG CAAGACTGCT TTTCAGGAAG
CCTTGGACGC TGCAGGTGAT AAAGTTGTAG TAGTTGACTT
100
CTCAGCCACG TGGTGTGGGC CTTGCAAAAT GATCAAGCCT
TTCTTTCATT CCCTCTCTGA AAAGTATTC AACGTGATAT
TCCTTGAAGT AGATGTGGAT GACTGTCAGG ATGTTGCTTC
200
AGAGTGTGAA GTCAAATGCA TGCCAACATT CCAGTTTTTT
AAGAAGGGAC AAAAGGTGGG TGAATTTTCT GGAGCCAATA
300
AGGAAAAGCT TGAAGCCACC ATTAATGAAT TAGTC

(6) 遺伝子が下記塩基配列(b)を有する請求項
(4)記載の遺伝子。

塩基配列(b):

1
ATGGTGAAGC AGATCGAGAG CAAGACTGCT TTTCAGGAAG
CCTTGGACGC TGCAGGTGAT AAACCTGTAG TAGTTGACTT
CTCAGCCACG TGGTGTGGGC¹⁰⁰ CTTGCCAAAT GATCAAGCCT
TTCTTTTCATT CCCTCTCTGA AAAGTATTCC AACGTGATAT
TCCTTGAAGT AGATGTGGAT GACTGTGAGG ATGTTGCTTC²⁰⁰
AGAGTGTGAA GTCAAATGCA TGCCAACATT CCAGTTTTTT
AAGAAGGGAC AAAAGGTGGG TGAATTTTCT GGAGCCAATA³⁰⁰
AGGAAAAGCT TGAAGCCACC ATTAATGAAT TAGTC

(7) 請求項(3)～(6)項記載の遺伝子を組み込んだプラスミド。

(8) 請求項(7)記載のプラスミドにより形質転換された原核、又は真核生物細胞。

(9) 原核生物細胞がエシェリヒア・コリである請求項(8)記載の細胞。

(10) 真核生物細胞がサッカロミセス・セレビシエである請求項(8)記載の細胞。

(11) 真核生物細胞がサル COS細胞である請求項(8)記載の細胞。

(12) 請求項(8)乃至(11)項記載の原核又は真核生物

ちインターロイキン2(以下IL2と略す)応答性を獲得していることを意味する。その機構は現在T細胞が抗原刺激を受けると同時に、抗原提呈能を持つマクロファージ等の付着性細胞から産生される可溶性因子インターロイキン1(以下IL1と略す)の刺激を受けることによるものとされている。

IL2は周知の通り細胞性免疫応答の中で中心的な機能を持っておりその機能はT細胞の分化増殖のみならず、B細胞の分化増殖、ナチュラル・キラー細胞(NK)、リンホカイン活性化キラー細胞(LAK)、単球などの活性化等、非常に広範囲に及ぶことが報告され、現在、癌および免疫不全の治療薬として積極的に開発研究が進められている。しかし、この様な免疫応答において中心的な機能を持つIL2でも、その機能発現を達成するには、標的細胞がすでにIL2応答性を賦与されていることが必須となっている。

現在IL2など免疫活性因子を主要とする免疫療法を考える場合、リガンドである免疫活性物質

細胞を培養して目的とするリコンビナントヒトADFポリペプチドを生産し、該リコンビナントヒトADFポリペプチドを培養液中^{あるいは細胞中}から採取することを特徴とするリコンビナントヒトADFの製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はリコンビナントヒトADFポリペプチド、ヒトADFをコードする遺伝子、該遺伝子を含有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された形質転換体及び該形質転換体を培養して目的とするリコンビナントヒトADFを製造する方法に関する。

ヒトADFはリンパ球等の血液細胞および繊維芽細胞に対して細胞分化増殖誘導などの活性を有する物質で、癌および免疫不全による疾患等に汎く治療薬として利用しうる有用な物質である。

〔従来の技術〕

抗原刺激を受け活性化されたT細胞はその膜表面上にインターロイキン2レセプター(以下IL2Rと略す)を発現していることが知られている。即

のみに目を向けるのではなく、リガンドに対する応答性、即ち、受容体の発現の有無と二者一体として捉える必要性が強く求められる。このことからIL2を癌および免疫不全等の治療薬として応用しようとする場合、よりIL2の投与量を抑え副作用をなくす事と、よりIL2の効果を顕立させるため、IL1等のIL2レセプター発現誘導因子との併用療法が考えられている。しかし、

IL1は周知の通り、生体内発熱物質であり、nativeな形で投与は不可能であり、同様な機能を持つ非発熱物質の開発が望まれていた。

ヒトADFは、初め、IL2RであるとされているTac抗原(Nature, 300, 267-269(1982), Proc. N.A.S. 80, 6957-6951(1983), Nature, 311, 635-638(1984))を誘導する物質としてヒト成人型T白血病患者より樹立したT白血病細胞株(以下「ATL細胞」と記す)の培養液上清中に存在することが見いだされた(J. Immunol. 134, 1623-1630(1985), J. Mol. Cell. Immunol. 2, 17-26.(1985))。

更にその後の研究により本発明のヒト ADF は IL1 活性を持ち、物質として既知物質の IL1- α 、 β とも構造を異にすることが確かめられた (Nature 315, 641 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7910 (1984))。IL1 の活性として現在報告されているものには IL2 の産生誘導、IL2R の発現誘導、B 細胞の分化増殖誘導、NK 細胞の活性化、血液細胞の増殖分化誘導、繊維芽細胞に対する増殖作用、などがある (J. Clin. Invest. 79, 319 (1987))。従ってこのヒト ADF も、IL2 および IL2R の発現を誘導することにより、生体内においては IL2 の T 細胞分化増殖作用等の活性を発現せしめさらには他の血液細胞の分化増殖を誘導せしめるものであるからして癌および免疫不全等の治療薬として広く応用され得ることが期待できる。

また後述のように(実施例 3)、ヒト ADF のアミノ酸配列は、大腸菌チオレドキシンと類似した構造を有していることが判明し大腸菌チオレドキシンの活性部位に共通な構造も保持している。ま

になったものは一つもない。また、高等動物チオレドキシンの機能面の解析も遅れており、高等動物におけるチオレドキシンの生理的な機能はいまだ不明である。しかしわずかながら近年、高等動物においてチオレドキシンは還元反応によってグルコルチコイドレセプターあるいはインシュリンレセプターを活性化するという報告がなされている (J. Biol. Chem. 258, 13658-13664, 1983; Biochemistry 25, 4381-4388, 1986)。

また、哺乳動物血清内に 2メルカプトエタノールによって活性化される細胞増殖因子が存在する (Lymphokines 4, Academic Press), あるいは、2メルカプトエタノール自身が細胞の分化、増殖を誘導する (J. Immunol. 121, 1899, 1987)、あるいは、2メルカプトエタノールが IL2 の機能を増強する (Microbiol. Immunol. 31, 691-700, 1987) といった報告がなされており細胞の増殖、分化において、2メルカプトエタノールが媒介するような、SH 基を介した還元反応が非常

なヒト ADF はチオレドキシン活性も有することから、ヒト ADF はヒトチオレドキシンと同一の蛋白質であると推定される。さて、チオレドキシンは大腸菌、酵母から高等植物、高等動物まで広く存在し、チオレドキシン分子内の S-S 結合-SH 基の交換反応を介して生体内の種々の酸化還元反応に関っていると考えられる。

ちなみに大腸菌チオレドキシンは、大腸菌の核酸代謝系においてリボスチオレオナドがデオキシリボスチオレオナドに変換される時、水素供与体として機能していることが知られている。また、大腸菌チオレドキシンの遺伝子も単離され全構造も明らかになっており、その上 X 線構造解析もなされ立体構造も明らかになり物理化学的な性質もよく検討されている (Ann. Rev. Biochem., 54, 237-71, 1985)。

一方、高等動物においては、ラット、マウス、牛などのチオレドキシンが単離されているが、それぞれ部分アミノ酸配列が明らかになっているのみで、全アミノ酸配列または遺伝子構造が明らか

に重要な役割を果たしていることが示唆されている。ところが、2メルカプトエタノールは、生体内には存在せず、生体における還元力供与体の実体はいまだ不明であるが、このチオレドキシンが上述の 2メルカプトエタノールの役割を担っていることは十分推察できる。

従って本物質は免疫応答のみでなく、細胞の増殖・分化および電子供与体として幅広く生体の酸化還元反応等の代謝に深く関与していることが考えられることから、免疫療法剤としてのみならず代謝異常を伴う炎症疾患、例えば肝炎等に非常に有効であることが考えられる。

さて従来、上述のヒト ADF を取得する為には、人末梢血などより分離した正常人 T 細胞をマイトゲン刺激するか、成人 T 白血病ウィルス (HTLV) でトランスフォームさせた T 細胞株から産生させる方法が採られてきた。しかしこの方法では、ヒト ADF の産生量が低いこと、マイトゲンを用いた場合、有害なマイトゲンが混入し、これを除去するのが困難である点、また T 細胞培養にはウシ胎

児血清など血清成分を培地に添加する必要があり、これら添加タンパク質とヒトADFを十分分離することが出来ず、ヒトADFを医療に用いるには、純化ヒトADFが得られぬことが障害となっている点など問題が多かった。

〔本発明が解決しようとする課題〕

本発明の課題はヒトADFをコードする遺伝子、該遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された原核生物細胞又は真核生物細胞を培養して目的とするヒトADFを製造する方法、及び、上記製造法で製造された純粋なりコンビナントヒトADFポリペプチドの提供にある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者等は上記課題を解決する為に鋭意研究を行った結果、ヒトADFをコードする遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定し、更に該ADF遺伝子を組み込んだプラスミドにより形質転換された原核生物細胞又は真核生物細胞を培養することにより、目的とする純粋なりコンビナントヒトADFを大量に得ることができたことより、本

ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI-1640培地で培養を開始する。安定な増殖を示す様になった後、徐々に粗IL2を培地から抜き培養開始数ヶ月後、10%FCSを含有したRPMI-1640培地のみに増殖、経代可能な細胞株を得る。得られた細胞株がATL細胞であることを確認するため、EロゼットOKTシリーズ、s-Ig, ATLA, T₈eなど表面形質を検索する。尚これらの抗原マーカーを説明すれば、いずれも良くしられたものであり、臨床面で広く用いられている。

Eロゼットはヒツジ赤血球に対するレセプターの検索であり、主にTリンパ球に発現されている。OKTシリーズにはOKT-3, 4, 6, 8などがあるが、T-3はT細胞抗原レセプター関連抗原であり、ヒト末梢血Tリンパ球の同定に、又T-4はヘルパーTリンパ球サブセットの同定に、T-6はβ-2ミクログロブリン関連抗原で、コモン胸腺由来Tリンパ球の同定に、T-8はサブレッサー/キラーTリンパ球サブセットの同定にそれぞれ用いられている。s-Igは細胞表面免疫グロ

ブリンであり、Bリンパ球に特異的に発現されている。ATLAはヒト成人T白血病抗原であり、ウィルス由来の蛋白質が抗原となっている。又T₈eはIL2Rであるとされている。これらの抗原に対するモノクローナル抗体はいずれも市販されているか、もしくは容易に入手可能であることからそれぞれのモノクローナル抗体にFITCを結合させ、検体の細胞と反応させれば容易に細胞表面抗原の同定ができるのでATL細胞か否かを研究できるわけである。

発明を完成に至らしめた。

本発明を以下に詳細に説明する。

人T細胞白血球ウィルス(以下「HTLV」と記す)により形質転換された人T細胞(ATL細胞)が高い効率でヒトADFを生産することはすでに知られている。その中で特にヒトADF産生量の多い細胞株としては、ATL-2細胞がある。

ヒトADFをコードする遺伝子を採用、同定する為にはまずATL-2細胞よりメッセンジャーRNA(mRNA)を採用することが必要である。ヒトADFが多量に生産されている時にmRNAも多量に生産されることより、ヒトADFを多量に生産される条件にATL-2細胞を位置付けることが必要である。そこで、まず、ATL-2細胞の樹立方法、及びATL細胞の培養条件について記す。

ATL細胞の樹立方法として一般的に知られている方法には次の2つがある。第1の方法はATLと診断された患者より末梢血を採取し、フィコール法を用いて白血球を得、ヒト末梢血、あるいはヒト脾細胞より調製した粗IL2を添加した10%

アリンであり、Bリンパ球に特異的に発現されている。ATLAはヒト成人T白血病抗原であり、ウィルス由来の蛋白質が抗原となっている。又T₈eはIL2Rであるとされている。これらの抗原に対するモノクローナル抗体はいずれも市販されているか、もしくは容易に入手可能であることからそれぞれのモノクローナル抗体にFITCを結合させ、検体の細胞と反応させれば容易に細胞表面抗原の同定ができるのでATL細胞か否かを研究できるわけである。

第2の方法は、ヒト成人T白血病ウィルス(ATLV)を用いた末梢血トランスフォーメーション(in vitro)である(Science, 217, 737 (1982))。即ちγ線(12000ラド)照射により、増殖能を完全に停止させたATLV産生ATL細胞例えばMT-2細胞と健康人由来末梢血をフィコール処理して得られた白血球細胞をともにRPMI-1640培地(10%FCS含有)中にて培養開始し、3~5日毎に培地交換を行う。培養開始2週間から一ヶ月後、経代可能な細胞株が得

られるようになるが、増殖が不安定な場合は、ヒト末梢血由来などのIL2を添加する。得られた細胞株がATL細胞であることを確認するためEロゼット、OKTシリーズ、 α -Ig, ATLA, Tacなどの表面形質の検索を第一の方法と同様に行なう。

本発明に用いたATL-2細胞はATL患者末梢血より樹立された細胞株である。

次にATL細胞の培養方法について記す。

ATL細胞を増殖させるにはウシ胎児血清(FCS)を含む培地にて、ATL細胞を培養し、ATLの細胞数を増やす。

この段階で細胞を分離洗浄して、mRNAを採取してもよい。また、細胞をFCSなどの蛋白質を含ませヒトADF生産用の完全合成培地に細胞を移し更に培養してから目的のmRNAを採取してもよい。

ATL細胞を培養するのに用いる培地の主成分は市販の培地でよい。例えばRPMI-1640培地、改良イーグル培地(MEM)、ダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)、又はクリック培地でよい。これらの培地に対する添加物としてI)1ml当たり

20~250単位、理想的には1ml当たり約100単位のペニシリン、II)1ml当たり1 μ g~100 μ g、理想的には1ml当たり10 μ gのゲンタマイシン、III)1ml当たり、20~250 μ g、理想的には100 μ gのストレプトマイシン、IV)1ml当たり約100~1000 μ g、理想的には1ml当たり約300 μ gの新鮮L-グルタミン、V)1~3g/L、理想的には2g/LのNaHCO₃、VI)5 $\times 10^{-4}$ ~5 $\times 10^{-5}$ M、理想的には5 $\times 10^{-5}$ Mの2-メルカプトエタノールなど必要に応じて用いることが出来る。尚、ATL細胞の細胞数を増やすのに最適な培地として、例えば上述の培地にさらに1~30%、好ましくは10%FCSを添加した培地を用いる。

ATL細胞の培養は種々の環境的条件下で行なわれる。しかし、好ましくはATL細胞培養物は約35°~37°Cの温度の範囲において約5%~10%の炭酸ガスを含む湿度調節空気中に保持すべきである。培養器としてはファルコン・ランウェア・ディヴィジョン、ベクトン・ディッキンソン・エン

ド・コーポレーション(Falcon Labware, Div. Becton, Dickinson and Co.)から市販されているファルコン皿3013又3025のような組織培養フラスコを使用することができる。又、上記ファルコン・ランウェアから市販されているボトル皿3027のようなローラボトル、あるいは、スピナージャーフラスコも使用することが可能である。

次に、ヒトADFをコードする遺伝子の同定・採取について記す。前述のヒトADF産生至適条件で培養されたATL-2細胞よりRNAを抽出、採取し、cDNAライブラリーを作成し、同ライブラリーよりヒトADFをコードするcDNAをクローニングする。このために本発明者らはATL-2細胞の産生するヒトADFのN末端アミノ酸部分配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、本合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて上述のcDNAと相補的にハイブリダイズするクローンを採取することによりヒトADF-cDNAを同定した。ここで得られたcDNAの塩基配列を常法により決定し、ヒトADFをコードする遺伝子の本体を物質的に確定し、

本遺伝子配列よりヒトADFが104個のアミノ酸より構成されるポリペプチドであることを見出した。これと同時にここに得られたcDNAを用いて原核生物細胞又は真核生物細胞において製造できる手法も確立した。すなわちヒトADFをコードする遺伝子を発現可能のようにベクターDNAに導入して得られた組み換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換細胞を培養すればよい。

組み換え体DNAが導入される宿主細胞はエシェリヒア・コリ、バチルス・サブテリス、その他の原核生物、及びサッカロミセス・セレビシエ、サルCOS細胞、マウスL細胞、CHO細胞、その他の真核生物細胞である。

形質転換された宿主細胞を培養する培地および培養方法は通常の培地、方法でよい。

形質転換された宿主細胞中にヒトADFが蓄積されている場合にはヒトADFは、当該分野の業者の容易になしうる方法で回収、精製する。簡単に記すと以下の通りである。培養後、速心で細胞を集め、必要に応じてリゾチームを含む溶液や他の

detergentを含む液に細胞を懸濁し、反応後、凍結・融解を繰り返して細胞抽出液を採取し、次に塩析、真空透析、限外濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、逆相クロマトグラフィー、ゲル電気泳動等の種々の方法によって精製できる。

尚、ヒトADFの活性は以下の方法で測定すればよい。

IL2R (Tac 抗原) の発現が調節的である NK 様細胞株である YT 細胞 (J. Immunol. 134, 1623-1630. (1985)) の、Tac 抗原発現誘導を指標としてヒトADFの活性測定を行なえばよい。即ち 3×10^5 コの YT 細胞をサンプル存在下、24 時間 5% CO₂ 通気中培養する。1% FCS 及び 0.1% NaN₃ を含むヘンクスバランسد溶液で 2 回洗浄し蛍光物質である FITC (fluorescein isothiocyanate) を結合した抗 Tac 抗体で 30 分間 40℃ で反応させ染色する。ネガティブコントロールとして FITC-ヤギ抗マウス Ig 抗体を用い

形質転換された原核生物により純粋なリコンビナントヒトADFの製造法も本発明により確立された。このように遺伝子工学的に製造されたリコンビナントヒトADFは従来の ATL 細胞の培養により製造されるヒトADFに比較してウィルス汚染等の心配もなく極めて有用である。

以下、本発明を実施例に従って説明する。

実施例 1

ヒトADF産生ATL細胞の樹立

ヒトADF産生ATL細胞としては、例えば ATL-2 細胞株がある。ATL-2 細胞株は成人 T 細胞白血病 (ATL) と診断された 61 才男子の末梢血より樹立したものである。培養開始時の患者末梢血は細胞核の異型性から白血病細胞と判定されたものであり、白血病細胞の表面形質は E ロゼット (+), OKT-3 (+), 4 (+), 6 (-), 8 (-), Ia (+) であり血清中の ATLA 抗体は陽性であった。培地は RPMI-1640 培地 (10% FCS 含有) にヒト末梢血、あるいは脾細胞由来の粗 IL2 を添加したものを用いた。培養開始 3 ヶ月後から安定

する。染色された細胞の蛍光強度はフローサイトメトリー (Spectrum II - Ortho Pharmaceutical Co., NJ) で測定し、陽性率を求め、ヒトADF活性に換算する。

一方、チオレドキシン活性は以下の方法で測定すればよい。還元型チオレドキシンによるインシュリンの S-S 結合の還元反応の速度を指標に、チオレドキシン活性が測定できる (J.B.C., 254, 9627-9632, (1979))。

即ち、分光光度計用ガラスセル内に 1 mg/ml インシュリン (Sigma 製)、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、2 mM EDTA、およびサンプルを共存させ、0.3-5 mM ジチオスレイトール (DTT) を添加して反応を開始する。インシュリンの還元反応に伴う 650 nm の吸光度の変化を記録し、チオレドキシン活性に換算すればよい。〔効果〕

癌、免疫不全及び肝炎等の炎症性疾患等の治療に有効なヒトADFの全塩基配列を初めて決定するとともに、該遺伝子を含有するプラスミドにより

な増殖を示す様になり、3~4 日毎の継代培養が可能になった。更に培養開始後 10 ヶ月前後から IL2 依存性を漸次脱し IL2 を添加しなくとも 10% の FCS を含む RPMI-1640 培地のみで増殖継代が可能となり、現在に至る迄、5 年 8 ヶ月にわたり継代培養が続けられている。ATL-2 の細胞の形質は E ロゼット (+), OKT-3 (-), 4 (+), 8 (-), Tac (+), SIg (-) であり、ATLA (+) で、電子顕微鏡により C 型レトロウィルス粒子 (ATLV) が多数観察される。

ATL 患者からは種々の表面形質を持つ ATL 細胞株が樹立されるが、ヒトADF産生細胞株の多くは ATL-2 細胞と同様 OKT-4 (+) 即ちヘルパーフェノタイプである。

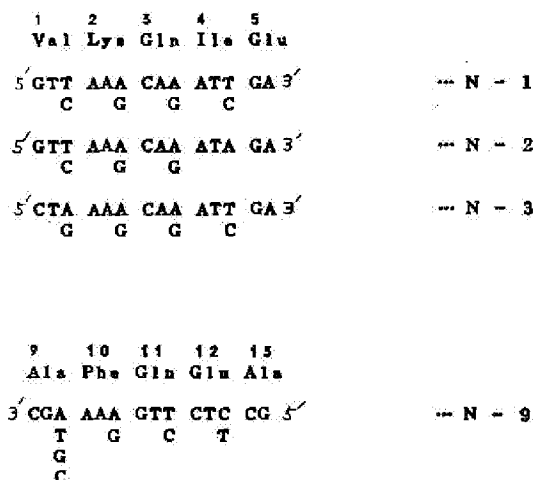
実施例 2

ヒトADFのN末端部分アミノ酸配列は既に決定されている (特開昭 62-19532)

即ち、Val-Lys-Gln-Ile-Glu-Ser-Lys-Thr-Ala-Phe-Gln-Gln-Ala-Leu-Asp-Ala-Ala である。

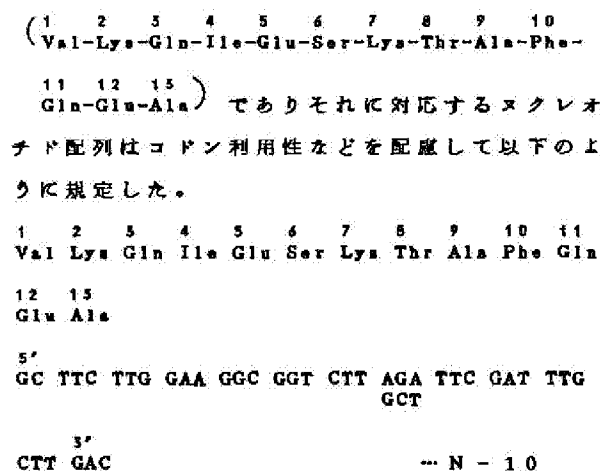
このヒト ADF の N 末端部分アミノ酸配列をコードする数種のオリゴヌクレオチドを下記のように合成した。

オリゴヌクレオチドの合成はアプライドバイオシステム社製 DNA シンセサイザー・モデル 380A を用い、シリカゲルを固相担体とし、重リン酸トリエステル法を用いてヌクレオチド結合反応を行った。常法により保護基を除去した後、C₁₈ 逆相カラム HPLC にてアセトニトリルグラジエントを用いて、目的のオリゴヌクレオチドを精製した。N 端アミノ酸フラグメント 1 (Val-Lys-Gln-Ile-Glu) とそれに対応するヌクレオチド配列の組合せは以下の通りである。



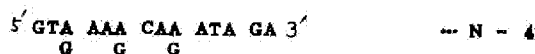
(32通りの混合物)

N 端アミノ酸フラグメント 4



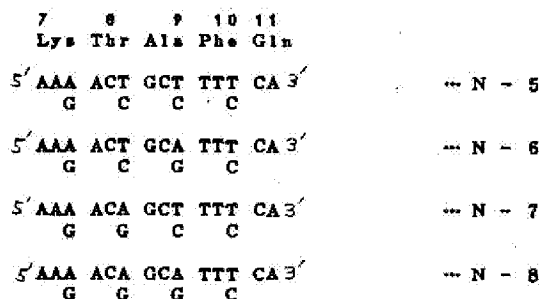
(2通りの混合物)

このようにして調製したオリゴヌクレオチドプロ



(合計 48通りの混合物)

N 端アミノ酸フラグメント 2 (Lys-Thr-Ala-Phe-Gln) とそれに対応するヌクレオチド配列の組合せは以下の通りである。



(各 16通りの混合物)

N 端アミノ酸フラグメント 3 (Ala-Phe-Gln-Glu-Ala) とそれに対応するヌクレオチド配列は以下の通りである。

ープを用いて後述するように目的とするヒト ADF 遺伝子取得した。

実施例 3

(1) 2 L 容プラスチックローラー培養瓶 (ファルコン # 3027) (以下ローラーと称する) 中の 1 L の 20 % FCS 含有 RPMI-1640 培地 (2 mM グルタミン、100 単位/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシン、16 mM NaHCO₃ を含有) に実施例 1 で得た 2 × 10⁵/ml 細胞数の ATL-2 を接種し、8 rpm で回転させつつ 3 日間、37℃ で培養した。培養後、培養物を遠心分離して細胞を集め PBS で 2 回細胞を洗った後細胞 (1.5 × 10⁹ 細胞) をヌクレアーゼ阻害剤である Ribonucleosides-Vanadyl complex (10 mM) を含んだ RSB 溶液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂) 800 μl に懸濁した。次に、NP-40 を 0.05 % になるように加えた後ゆるやかに攪拌後、3000 rpm で 5 分遠心して核を含む細胞 debris を除去し、その上清液に SDS (最終濃度 0.5 %) と EDTA (最終

濃度 5 mM) を加えた後、直ちにフェノールを等量加え、細胞質 RNA を抽出した。合計 3 回フェノール抽出を繰り返してから、2 容エタノールで RNA を沈澱し、遠心でこの沈澱を集め、10 mM Tris-HCl, pH 7.5 で溶解した。このようにして ATL-2 細胞から得られた RNA 量は 25 μ g であった。

次にこの RNA から mRNA を取得するためにオリゴ(dT)-セルロース (P.L. Biochemicals, Type 7) を用い、カラムクロマトグラフィーを行なった。吸着は 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS 溶液に RNA を溶解して行ない、緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA) で洗浄後、溶出は水と 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) で交互に mRNA を溶出することにより行なった。この結果溶出された mRNA 量は 480 μ g であった。

(4) (4) で調製した mRNA 5 μ g を用いて二重鎖 cDNA を作製した。GUBLER, U と HOFFMAN, B,

を不活化するため EcoRI メチラーゼによりメチレーションを行なった。0.8 μ g の cDNA と 200 units の EcoRI メチラーゼを 37°C, 60 分間反応させ、更に 70°C, 10 分間反応させた。

次に EcoRI リンカーを EcoRI メチラーゼにより修飾を受けた cDNA に T4 DNA リガーゼにより付加させた。反応は 15°C で一晩行い、引き続き 70°C, 10 分間反応させた。

さらに両端に EcoRI リンカーを持つ cDNA を EcoRI により切断し、切断後、cDNA と EcoRI の切断で生じた小断片をゲル濾過法により分離した。この様にして EcoRI の接着末端を両端にもつ cDNA が調製された。

(5) 次に本 cDNA を λ gt10 ファージベクター DNA のアームに連結するため、cDNA と λ gt10 アームを T4 DNA リガーゼ存在下、15°C で一晩反応させた。こうして cDNA とライゲーションされた λ gt10 ベクター DNA アームが調製された。

次に本 cDNA クローニングシステムキット (アマシヤム製) の Extract A および Extract B を加

J., (Gene 25, 263, 1983) の方法に従い、cDNA 合成キット (アマシヤム社製) を用いアマシヤムのプロトコールによって二重鎖 cDNA を作製した。すなわち、mRNA より逆転写酵素によりシングルストランド cDNA を合成し、mRNA と cDNA のハイブリッドを基質として、大腸菌リボヌクレアーゼ H を利用して RNA 鎖にニックとギャップを形成した。さらに大腸菌 DNA ポリメラーゼ I によって、ニックトランスレーションタイプの反応により mRNA を DNA に置き換え二重鎖 DNA を作製した。この 3' 末端にある小さなオーバーハングを T4 DNA ポリメラーゼを用いて除去し、二重鎖 cDNA を作製した。最終的に得た二重鎖 cDNA は 1.48 μ g であった。

(6) cDNA ライブラリーの作成にはアマシヤムの λ gt10 ファージを用いた cDNA cloning system を採用した。(6) で得られた cDNA を λ gt10 ファージ DNA ベクターのアームに結合させるため、cDNA の両端に EcoRI 切断部位リンカーを付加した。即ち、まず、cDNA 上の EcoRI site

を *in vitro* パッケージングを行い、ATL-2 由来の cDNA を内部に組み込んだ成熟 λ gt10 ファージ粒子が調製された。尚、この cDNA が組み込まれている本ファージは大腸菌の中で容易に複製し、溶菌活性を示し、プラークを形成するが cDNA を組み込んでいないファージは複製することはできず、cDNA を組み込んだファージだけを効率的に選択することができる。

cDNA を組み込んだ λ gt10 ファージ粒子のタイトレーションを行なったところ、cDNA 0.15 μ g よりおよそ 100 万個のプラークを形成するファージ溶液が調製できた。

(7) 得られたファージ溶液を 8 M ペプファール (NaCl 5.8 g, MgSO₄ · 7H₂O 2 g, 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 50 ml, 2% Gelatin 5 ml per liter) で希釈し、3 ml にした。Maltose 0.2% を含む液体培地で、一晩培養しておいた E. coli NM 514 株 6 ml をこのファージ希釈液と混合し、37°C で 20 分間放置した。その 300 μ l ずつを 50°C に保温しておいた 0.7% アガロースを含

むLB培地7mlと混合し、予めLB寒天培地の入った15cm直径のシャーレに重層し、37℃で一晩、インキュベートした。30枚のプレートには各々約3万強のプラークが得られ、寒天表面のほぼ全域をおおっている。そのプラーク中のファージをニトロセルロースフィルターに接触させることによって吸着させた。

次にこのファージが吸着したフィルターを0.5N NaOHで処理し、さらに0.5M Tris-HCl (pH 7.5) バッファーで中和し、2×SSC (0.3M NaCl, 0.03M Na-Citrate) でリンスしたのち風乾し、80℃, 2hrの処理により、ファージDNAをフィルターに固定した。DNAを固定したフィルターを65℃で、5×SSC, 0.1% SDSの溶液で2回処理し、さらに5×SSC, 0.1% SDS, 1×デンハルト液 (0.2% フィコール, 0.2% ポリビニルピロリドン, 0.2% 牛血清アルブミン), 100 μg/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液で37℃, 一晩ハイブリダイズした。次に5×SSC, 0.1% SDS, 1×デンハルト液に5'末端をカイネ

0.2% Maltose 入りLB培地で培養したNM514の培養液1mlと混合し、37℃, 20分間放置する。次に、この混液に4mlのLB培地を加え、37℃, 4時間振盪する。その後、クロロホルムを100 μl 加え、さらに37℃, 15分振盪して菌体を完全に溶菌させる。培養液を遠心して菌体の破砕物を取りのぞいてファージ液とした。20種のファージ液各1 μl をニトロセルロースフィルターに点下し、0.5N NaOHで変性させた後、0.5M Tris-HCl (pH 7.5) で中和し、2×SSCでリンスして80℃, 2hrの処理によりDNAをフィルターに固定した。このフィルターを実施例2で調製したプローブでN-1~4, N-5~8, N-9でハイブリダイズを行なったところ、28℃でファージDNA番号の#3と#14をのぞく18株についてすべてのプローブがハイブリダイズした。

(h) そこでいずれのプローブともハイブリダイズした#20について以下の方法で大量にファージを調製した。まず単離プラークをかきとって

ーションによりラベル化したプローブN-10 (実施例2) を100万cpm/ml入れた溶液で50℃, 一晩ハイブリダイズを行なった。その後、5×SSC, 0.1% SDSの溶液で50℃で数回洗ったのちフィルターを風乾しオートラジオグラフィーを行なった。

その結果、ポディティブなプラーク75株が得られた。さらにそのフィルターを55℃で数回洗い、一晩のオートラジオグラフィーを行ったところ、20株のポディティブなプラークに絞られた。これらのプラークは他のプラークと混ざっており、純粋ではないのでこの20のプラークにつきポディティブな所からプラークをかきとり、ファージを希釈して、再度大腸菌E.coli NM514と共にプレートに撒き、ポディティブプラークとしてシングルプラーク化した。これらの単離されたポディティブプラークからファージを調製した。

(i) ファージの小規模調製法は、ポディティブプラークをかきとり8M バッファー1mlで懸濁することによりファージ液をつくり、この0.5mlを

8M バッファー1mlに懸濁後、その中のファージ数を希釈したE.coli NM514と共に撒きプラークを形成させることによって予め計算しておく。次に、15cm直径のプレートに2×10⁵ プラークが出現するように計算してE.coli NM514と共に撒きプラークを形成させる。プラークはほぼ前面にひろがりプラークの形をなさない。これを10mlの8M バッファーで溶出し、ファージを集め、菌体の破片を遠心分離によりのぞく。次にこの上清に1mg/mlのDNaseとRNaseを添加して、37℃, 1時間放置した後、等量の20% ポリエチレングリコール, 2.5M NaClの溶液を加え、よく混合して0℃, 2時間放置した。遠心分離により得た沈澱を2mlの8M バッファーに溶解し、フェノール抽出3回、クロロホルム3回の処理によりファージのタンパク質とDNAを分離する。水層に1/10容の3M NaOAcを加え、2倍量の冷エタノールを加える。-80℃で冷却し、遠心によりエタノール沈澱を回収する。冷エタノールでリンスし、水にとかしてファージDNA標品とする。

例 この#20のファージDNAをEcoRIで切断したところ、約600塩基対のcDNAインサート断片を得た。この断片をアガロースゲルから回収してニクトランレーションによってラベル化したものをプローブとして先の(イ)で調製したフィルターとハイブリダイズさせたところ#3と#14を除く18株のファージにハイブリダイズした。すなわち#3と#14を除くこの18株は全て同種のcDNA遺伝子を持つことが明らかになった。

そこで#20のcDNAについて制限酵素地図と塩基配列を決定した。塩基配列はM13ファージ(J. Messing et al., Gene, 19, 269('82))を使ったジデオキシヌクレオチド鎖終結法(F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463('77))の方法により決定した。決定された塩基配列およびアミノ酸配列を第1図に示した。また制限酵素地図は第2図に示した。

ここに決定されたアミノ酸配列は実施例1で示されたヒトADF N末端アミノ酸部分配列構造を正確に含むことよりこの#20のcDNAは目的と

するヒトADF遺伝子であることは明白である。

尚、ATL細胞が産生するヒトADFポリペプチドのN末端はValで有るが、これは、開始コドンATGより翻訳されるMetが細胞より分泌される過程でMetが切断された為と考えられる。しかし、MetがN末端に付加されたポリペプチドも同等のヒトADF活性を示すことより、本発明においてはN末端にMetが付加されたポリペプチドも付加されていないものも、ヒトADFとすることにする。

また、コンピューターを用いてヒトADFと既知の蛋白質との相同性を調べたところ、表のように、大腸菌、ラット由来のチオレドキシンと相同性があり、特にチオレドキシンの活性部位とその周辺の相同性が高いことが判明した。

尚、チオレドキシンの活性部位は表1の3段目～4段目のCYS GLY PRO CYSである。

(注) a: ヒトADF

b: ラット ノビコフ、ヘパトーマ(Rat

Nevikoff Hepatoma)

チオレドキシン(Thioredoxins Structure and Function 1981, pp1-288, CNRS,

c: 大腸菌チオレドキシン(Ann. Rev. Biochem. 1985, 54, 237-271)

XXX: 未同定アミノ酸

[実施例4] 抗ADF抗体の作製

決定されたヒトADFアミノ酸配列をもとに、N末10残基(Val-Lys-Gln-Ile-Glu-Ser-Lys-Thr-Ala-Phe)、第34残基から16残基(Cys-Lys-Met-Ile-Lys-Pro-Phe-Phe-His-Ser-Leu-Ser-Glu-Lys-Tyr-Ser)、C末28残基(Gln-Phe-Phe-Lys-Lys-Gly-Gln-Lys-Val-Gly-Glu-Phe-Ser-Gly-Ala-Asn-Lys-Glu-Lys-Leu-Glu-Ala-Thr-Ile-Asn-Glu-Leu-Val)

を選び、それぞれペプチドシンセサイザー(アブライド・バイオシステムズ)により合成ペプチド

表-1 ヒトADFとチオレドキシンのN末端アミノ酸配列の比較

a:	Val	Lys	Gln	Ile	Gln	Ser	Lys	Thr	Ala	---	---	---
b:	Val	Lys	Gln	Ile	Asn	XXX	Lys	Glu	Ala	---	---	---
c:	Ser	Asp	Lys	Ile	His	Leu	---	Thr	Asp	Asp	Ser	Ser
	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	---	Ala	Ala	Gly	Asp	Lys
	Phe	Gln	Gln	Ala	Leu	Ala	---	Ala	Ala	Gly	Asp	XXX
	Phe	Asp	Thr	Asp	Leu	Val	Lys	Ala	Asp	Gly	Ala	Ile
	Leu	Val	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Ala	Thr	Trp	Cys	GLY
	Leu	Val	Val	Val	Asp	Phe	XXX	Ala	XXX	Trp	Cys	GLY
	Leu	Val	---	---	Asp	Phe	Trp	Ala	Glu	Trp	Cys	GLY
	PRO CYS	Lys	Met	Ile	Lys	---	---	Pro	Phe	---	---	---
	PRO CYS	Lys	Met	Gln	XXX	Pro	XXX	Pro	XXX	Phe	---	---
	PRO CYS	Lys	Met	Ile	Ala	Pro	Ile	Leu	---	---	---	---

を作製した。次に、常法によりそれぞれ合成ペプチドをキャリアーである牛血清アルブミンにコンジュゲートした後、Adjuvant Complete/Incomplete Freund (DIFCO 製) と共にうさぎに免疫し、抗 ADF 抗血清を得た。得られた抗血清を用いて、イムノプロットングを行ったところ、得られた 3 種のいずれの抗血清も精製ヒト ADF 蛋白質を認識することが出来た。

【実施例 5】 ヒト ADF 発現用組み換え DNA の構築 (原核生物)

プラスミド pT13S(Neo) (文献: 村松正実編「医学における遺伝子工学」p146 (1987) 現代化学増刊), 実施例 3 で得た $\phi 20$ cDNA, および合成アダプター DNA (a, 5' GAT CTC TTC AGA GTG AAG CAG AT3', 23 mer, b, 5' C GAT CTG CTT CAC TCT GAA GA3', 21 mer) を用いて、ヒトインターロイキン-2 (HIL-2) の部分 N 末端とのヒト ADF 融合蛋白質 (4HIL-2-ADF) を生産する組み換え DNA (pTfADF-1, pTfADF-2) を構築した (第 3 図)。

ミド pTfADF-1 を制限酵素 BamHI で切断し、アガロースゲル電気泳動で大、小 DNA 断片をそれぞれ単離精製した。さらに、小断片を制限酵素 TaqI で切断し TaqI-BamHI 断片 (~350 bp) を得た。pTfADF-1 の BamHI 切断大断片と、TaqI-BamHI 断片および合成 DNA a, b フラグメントを混合し、T4DNA リガーゼを用いて連結した後、得られた組換え DNA を E. coli HB101 株に導入し、アンピシリン耐性株を選択した。得られた株よりコロニーハイブリダイゼーション法 (実施例 3 参照) により合成 DNA a とハイブリダイズするプラスミド DNA を有する株を選択した。得られた株からプラスミド DNA を抽出し制限酵素による切断試験を行うことにより TaqI-BamHI 断片が合成アダプターを介してトリプトファンプロモーターの下流、正方向に挿入された pTfADF-2 を保持する菌 (pTfADF-2/HB101, FERM BP¹⁸⁸⁵) を選定した。

【実施例 6】 E. coli を宿主としたヒト ADF 蛋白質の産生

(1) プラスミド pTfADF-2 を保持する E. coli

(1) プラスミド pT13S(Neo) を制限酵素 SaeI および StuI で切断し、アガロースゲル電気泳動で大断片を単離精製した後、T4DNA ポリメラーゼで末端を平滑化した。一方、 $\phi 20$ cDNA を制限酵素、EcoRI および DraI で切断し、アガロースゲル電気泳動でヒト ADF cDNA インサートを含む DNA 断片を単離精製した後、同様に T4DNA ポリメラーゼで末端を平滑化した。このようにして調製したトリプトファンプロモーター/オペレーターを含む pT13S(Neo) 断片とヒト ADF cDNA を含む EcoRI-DraI 断片を混合し、T4DNA リガーゼを使って連結した後、得られた組換え DNA を E. coli HB101 株に導入し、アンピシリン耐性株を選択した。得られた株からプラスミド DNA を抽出し、制限酵素による切断試験を行うことにより、pT13S(Neo) の SaeI サイト下流にヒト ADF cDNA の EcoRI-DraI フラグメントが正の方向に挿入されたプラスミド pTfADF-1 を保持する菌 (pTfADF-1/HB101) を選定した。

(2) 次に、第 3 図及び 4 図に示すようにプラス

HB101 株 (pTfADF-2/HB101, FERM BP¹⁸⁸⁵) を 25 μ g/ml ストレプトマイシンおよび 25 μ g/ml アンピシリンを含む L 培地 (1% バクトトリプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5% NaCl, 0.1% グルコース, pH 7.5) 100 ml 中で 37℃ 一晚生育させた。ついで培養懸濁液 5 ml を M9-カザミノ酸培地 (0.6% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.3% KH₂PO₄, 0.05% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.00147% CaCl₂, 0.2% グルコース, 0.2% カザミノ酸, 0.02% L-ロイシン, 0.02% L-プロリン, 0.0002% チアミン塩酸塩, 100 μ g/ml アンピシリン, 25 μ g/ml ストレプトマイシン, pH 7.4) 100 ml へ接種し、28℃ にて 3 時間培養した。その後 25 μ g/ml になるまで 3-インドールアクリル酸を添加し 23℃ にて 21 時間誘導培養した。培養後、菌体を光顕微鏡下 (1000 倍) で観察したところ、菌体内に顆粒の形成を確認した。

遠心分離により菌体を集め、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 20 ml に懸濁し、そこにリ

ゾナーム 20 号, 0.5 M EDTA 5 ml を添加し、かくはんした後、水中にて 30 分放置した。次いで超音波破砕（水中、15 分間）により菌体を破壊し、10,000 rpm、5 分間の遠心分離で顆粒画分を回収した。

この顆粒画分を、8 M 尿素, 5 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 5 ml に懸濁し、室温に 8 時間放置することにより顆粒を可溶化した。可溶化顆粒の一部を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびイムノブロッティング法により分析したところ顆粒画分の全蛋白質の約 50% が抗ヒト ADF 抗体と反応する、分子量約 21,000 のヒト IL-2 融合ヒト ADF 蛋白即ち ΔHIL-2-ADF であることを確認した。収量は約 2 号であった。尚、ΔHIL-2-ADF は、下記のアミノ酸配列を有する。

Met Ala

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Glu Met
Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro
Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr
Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Phe Pro Ser Leu
Glu Ala Leu Phe Gly Ala Leu Asp Leu Phe Arg
Val-Lys-Gln-Ile-Glu-Ser-Lys-Thr-Ala-Phe-Gln-
Glu-Ala-Leu-Asp-Ala-Ala-Gly-Asp-Lys-Leu-Val-
Val-Val-Asp-Phe-Ser-Ala-Thr-Trp-Cys-Gly-Pro-
Cys-Lys-Met-Ile-Lys-Pro-Phe-Phe-His-Ser-Leu-
Ser-Glu-Lys-Tyr-Ser-Asn-Val-Ile-Phe-Leu-Glu-
Val-Asp-Val-Asp-Asp-Cys-Gln-Asp-Val-Ala-Ser-
Glu-Cys-Glu-Val-Lys-Cys-Met-Pro-Thr-Phe-Gln-
Phe-Phe-Lys-Lys-Gly-Gln-Lys-Val-Gly-Glu-Phe-
Ser-Gly-Ala-Asn-Lys-Glu-Lys-Leu-Glu-Ala-Thr-
Ile-Asn-Glu-Leu-Val

(a) クロストリペインによる切断

ΔHIL-2-ADF は、ヒト IL-2 部分とヒト ADF

との接続部分に、-Phe-Arg- なるアミノ酸配列を含むように、遺伝子が構築されている（第 4 図）。クロストリペインまたはカリクレインを用いて上記配列の Arg の C 末端ペプチド結合を切断することにより、ΔHIL-2-ADF から天然型アミノ酸配列を有するヒト ADF 蛋白質に変換できる。

可溶化顆粒 5 ml (ΔHIL-2-ADF 2 号を含む) を蒸留水で 2 倍希釈し、終濃度 0.1 M になるように CaCl₂ を添加した後、クロストリペイン (Sigma 社) 20 ユニット (200 μg) を添加し、室温で 8 時間切断反応を行った。

反応溶液の一部を用いて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびイムノブロッティングによる分析を行い、ΔHIL-2-ADF の 80% 以上が天然型の分子量約 13,000 のヒト ADF 蛋白質に変換されたことを確認した。ヒト ADF 蛋白質は、下記のアミノ酸配列を有すると考えられる。

1
Val-Lys-Gln-Ile-Glu-Ser-Lys-Thr-Ala-Phe-Gln-
Glu-Ala-Leu-Asp-Ala-Ala-Gly-Asp-Lys-Leu-Val-
Val-Val-Asp-Phe-Ser-Ala-Thr-Trp-Cys-Gly-Pro-
Cys-Lys-Met-Ile-Lys-Pro-Phe-Phe-His-Ser-Leu-
Ser-Glu-Lys-Tyr-Ser-Asn-Val-Ile-Phe-Leu-Glu-
Val-Asp-Val-Asp-Asp-Cys-Gln-Asp-Val-Ala-Ser-
Glu-Cys-Glu-Val-Lys-Cys-Met-Pro-Thr-Phe-Gln-
Phe-Phe-Lys-Lys-Gly-Gln-Lys-Val-Gly-Glu-Phe-
Ser-Gly-Ala-Asn-Lys-Glu-Lys-Leu-Glu-Ala-Thr-
100
Ile-Asn-Glu-Leu-Val

(b) リコンビナント ヒト ADF の純化

(a) で得られたヒト ADF 溶液を、4 M 尿素 - 2.5 mM DTT - 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Mono QHR5/5 陰イオン交換カラム (ファルマシア製) に添加した後、NaCl の直線濃度勾配 (7.5 mM/min, 流速 0.5 ml/min) により蛋白質を溶出した。カラム操作は、ファースト・プロテイン・リキャッド・クロマトグラフィー、FPLC システム (ファルマシア製) を用いた。

100~200 mM NaCl 濃度で溶出されたヒト ADF 蛋白質を含む画分を、0.1%トリフロロ酢酸 (TFA) で平衡化した C_8 逆相クロマトグラフィーカラム (A-211- C_8 , Yamamura Chemical Laboratories, Co., Ltd., Japan) に添加した後、0.1% TFA を含むイソプロピルアルコールの直線濃度勾配 (1%/min, 流速 0.5 ml/min) により蛋白質を溶出した。カラム操作は、高速液体クロマトグラフィー、HPLC システム (日立製) を用いた。ヒト ADF 蛋白質は 40% イソプロピルアルコール濃度で溶出された。

約 100 μ g の精製標品が得られ、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動および銀染色法 (半井化学製) で分析した結果、分子量約 13,000 の均一の蛋白質であることが確認された。また、ADF 活性 (比活性 5×10^6 U/mg) およびチオレドキシン活性 (比活性 5 U/mg) をともに保持していた。

[実施例 7] 酵母でのヒト ADF 発現用組み換え DNA の構築

(*leu 2*, *his 4*, *can 1*, *clr⁺*) を 500 ml 容量瓶とフラスコ中の 100 ml YPD 培地 (1% 酵母エキス, 2% ポリペプトン, 2% グルコース, pH 5.3) で 30℃ にて好氣的に振とう培養した。指数増殖期中期 (610 nm における吸光度 0.8) に 3500 rpm で 5 分間遠心分離して細胞を集め、TE 緩衝液 (1 mM トリス-塩酸, pH 7.5, 0.1 mM EDTA) で 1 回洗浄し、同じ緩衝液 5 ml に懸濁した。この細胞懸濁液の 0.5 ml を試験管にとり、これに 0.2 M CH_3COOLi または 1.0 M $CaCl_2$ を同量添加し、次いで懸濁液を 30℃ で 1 時間振とうした。懸濁液の細胞を 3500 rpm で 5 分間遠心分離して集め、1 M ソルビトールで 1 回洗浄し、チモリアーゼ (Zymolyase) 5000 溶液 (1 M ソルビトール, 0.1 M クエン酸緩衝液-10 mM EDTA-0.4 mg/ml チモリアーゼ 5000) 1 ml に再び懸濁した。この懸濁液を 37℃ で 1 時間緩かに振とうしてプロトプラストを調製した。このプロトプラストを 1 M のソルビトールで 3 回洗浄し、1 M ソルビトール-10 mM $CaCl_2$ -10 mM トリス-塩酸の

酵母-大腸菌シャトルベクター pAM82 (A. Miyahara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5 (1983)) と、実施例 3 で得た ϕ 20 cDNA を用いて酵母細胞内でのヒト ADF 蛋白質の発現が可能な組み換え DNA を構築した (第 5 図)。

ベクター pAM82 を制限酵素 XhoI で切断し、また一方 ϕ 20 cDNA を制限酵素 EcoRI で切断し、両者を T4 DNA ポリメラーゼを用いて末端を平滑化した後、T4 DNA リガーゼを用いて結合した。得られた組換え DNA を *E. coli* HB101 株に導入してアンピシリン耐性株を選択し、得られた株からプラスミド DNA を抽出し制限酵素による切断試験を行うことにより、ヒト ADF cDNA が pAM82 の Pho5 プロモーター下流、正方向に挿入されたプラスミド pAM82 ADF-1 を選定した。

次に、得られたプラスミド pAM82 ADF-1 をサッカロミセス・セレビシエ AH22 へ以下の如く導入した。

サッカロミセス・セレビシエ AH22 の細胞

溶液 1.0 ml (pH 7.5) に再懸濁した。プラスミド DNA (pAM82 ADF-1) を 20 μ g/ml となるようにプロトプラスト懸濁液に添加し、この混合物を 5 分間室温でインキュベートした。次いで、40% ポリエチレングリコール 4000-10 mM $CaCl_2$ -10 mM トリス-塩酸の溶液 (pH 7.5) 5 ml をこの混合物に加え、10 分後遠心分離してプロトプラストを沈殿せしめ、1 M ソルビトール-10 mM $CaCl_2$ -10 mM トリス-塩酸の溶液 (pH 7.5) 5 ml に再懸濁した。懸濁液の一部 0.2 ml を 10 ml 再生寒天培地に加え、0.1 M ソルビトール, 0.67% ディブコ・イースト・ナイトロジエン・ベース, 2% グルコース・アミノ酸混合溶液 (L-グルタミン酸, L-アスパラギン酸, L-アラニン, L-プロリン, L-スレオニン, L-セリン, L-トリプトファン, L-イソロイシン, L-バリン, L-フェニルアラニン, L-チロシン, L-メチオニン, グルシン, L-グルタミン, L-アスパラギン, L-リジン, L-シスチン, L-ヒスチジンおよび L-アルギニン各 5 mg/ml を含む) お

よび2多量天から成る最小寒天プレート(pH 5.3)上に展開し、Leu⁺トランスフォーマントを選択した。

この形質転換体、即ち^{サッカロミセス・セレビシエ}pAM82ADF-1を含む/AH22(pAM82ADF-1/AH22, FERM BP⁽¹⁸⁸⁴⁾)を30℃で好氣的にヒスチジン(2.0 μg/ml)を補充した100 mlの高リン酸バーホルダー(high-phosphate Burkholder)最小培地(20.0 g/L グルコース, 2.0 g/L アスパラギン, 1.5 g/dl KH₂PO₄, 2.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.33 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.1 mg/L KI, 0.25 mg/L FeSO₄·7H₂O, 0.04 mg/L MnSO₄·4H₂O, 0.02 mg/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.60 mg/L H₃BO₃, 0.04 mg/L CuSO₄·5H₂O, 0.31 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.20 mg/L サイアミン塩酸塩, 10.0 mg/L イノシトール, 0.2 mg/L パントテン酸カルシウム, 0.2 mg/L ピリドキシン塩酸塩, 0.05 mg/ml パラ-アミノ安息香酸, 9.20 mg/L ニコチン酸および2.0 r/L ビオチンを含有、pH 5.3)中で培養した。細胞密

度(μg/ml), 1.2 M ソルビトール, 5.0 mM リン酸塩(pH 7.2)および1.4 mM 2-メルカプトエタノールを含む溶液5 ml中に懸濁し、懸濁液を30℃で30分間インキュベートした。遠心分離してプロトプラストを集め、0.1多トリトンX-100/5.0 mM リン酸塩(pH 7.2)1 mlおよびフェニルメチルスルフェニルフロライド1 mM 中に分離した。分離物(lysate)を11000 rpmで20分間遠心分離して清澄にした。

清澄化した分離物を用いて、イムノプロッティングおよびADF活性、チオレドキシン活性の測定を行った。低リン酸誘発サンプル中には、抗ヒトADF抗体と反応する分子量約13,000の蛋白質の発現と、5×10³ U/mlのADF活性および5×10⁻³ U/mlのチオレドキシン活性の発現が見られた。それに対して、対照のサンプル即ち高リン酸誘発サンプルのみで培養したものはヒトADF蛋白質の発現も、ADF活性およびチオレドキシン活性の発現も見られなかった。これは低リン酸条件で発現するプロモーターPho5を用いている為高リン酸条

度が610 nmにおける吸光度で0.4に達した時サンプルを取り出し遠心分離して低リン酸最小培地(20.0 g/L グルコース, 2.0 g/L アスパラギン, 1.5 g/L KCl, 2.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.33 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.1 mg/L KI, 0.25 mg/L FeSO₄·7H₂O, 0.04 mg/L MnSO₄·4H₂O, 0.02 mg/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.6 mg/L H₃BO₃, 0.04 mg/L CuSO₄·5H₂O, 0.31 mg/L ZnSO₄·7H₂O, 0.2 mg/L サイアミン塩酸塩, 10.0 mg/L イノシトール, 0.2 mg/L パントテン酸カルシウム, 0.2 mg/L ピリドキシン塩酸塩, 0.05 mg/L パラ-アミノ安息香酸, 9.2 mg/L ニコチン酸 and 2.0 r/L ビオチンを含有、pH 5.3)100 ml中で懸濁して誘発させた。対照のサンプルは途中で低リン酸培地に移さない以外は同様に処理した。610 nmにおける細胞密度が吸光度で0.8に達した時、誘発した培養液と誘発しなかった培養液のサンプル100 mlを遠心分離した。

得られた細胞をチモリアーゼ500(100

件では発現しない為である。

〔実施例8〕(サルCOS細胞を宿主としたヒトADF蛋白質の産生)

SV40プロモーターを有する岡山・バーグ発現ベクターpCDα(H.Okayama & P.Berg., Mol. Cell. Biol. 3: 280-289 (1983))と、実施例3で得たφ20 cDNAを用いてサルCOS7細胞でヒトADFの発現が可能な組み換えDNAを構築した(第6図)。

(i) ベクターpCDαを制限酵素BamHIで切断しT4DNAポリメラーゼを用いて末端を平滑化した後、T4DNAリガーゼを用いてEcoRIリンカーを接続した(pCD(Eco))。

次に、φ20 cDNAとプラスミドpCD(Eco)を制限酵素EcoRIで切断した後T4DNAリガーゼを用いて結合し、得られた組換えDNAをE.coli HB101株に導入してアンピシリン耐性株を選択した。得られた株からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素による切断試験を行うことによりヒトADF cDNAがSV40プロモーターの下流、正方向

に挿入されたプラスミド pGDADF-1 を選定した。

(b) サル COS-7 細胞へのプラスミド DNA の
感染法

E.coli を用いた培養によりプラスミド pGDADF-1 を増幅し、CaCl₂ 超遠心法により精製し、サル細胞トランスフェクション用 DNA とした。

COS-7 細胞を 1×10^5 /ml になる様に 10 % 牛胎児血清含有 RPMI に懸濁し、この 3 ml 分を 6 cm シャーレにて 5 % 炭酸ガスインキュベーター内 37℃ で一夜培養した。培養上清を除去し、新しい 10 % 牛胎児血清含有 RPMI 3 ml を加え、37℃、5 % 炭酸ガスインキュベーター内で 2 時間培養した。培養後、上清を除去し、TBS (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM Na₂HPO₄) 2.5 ml にて 1 回細胞を洗った後、プラスミド pGDADF-1 2 µg を含む、DEAE-アキストラン-TBS 溶液 (500 µg/ml DEAE-アキストラン、25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM Na₂HPO₄, 0.7 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂) 1

ml を加え、37℃、5 % 炭酸ガスインキュベーター内で 4 時間培養した。培養後、上清を除去し、150 µM クロロキンを含む TBS 2.5 ml を加え、37℃、5 % 炭酸ガスインキュベーター内で 5 時間培養を続けた後、上清を除去し、TBS 2.5 ml で 2 回細胞を洗い、10 % 牛胎児血清含有 RPMI 3 ml を加え、37℃、5 % 炭酸ガスインキュベーター内で一夜培養した。翌日、上清を除去し 1 % 牛胎児血清含有 RPMI 3 ml を加え 37℃、5 % 炭酸ガスインキュベーター内でさらに 2 日間培養を続けた。培養後、上清を回収し、遠心限外濾過減縮装置 セントリコン-10 (アミコン) を用いて 10 倍に減縮した後、イムノプロットングおよび ADF 活性、チオレドキシン活性の測定を行った。

pGDADF-1 を導入したサル COS-7 細胞の培養上清には、抗ヒト ADF 抗体と反応する分子量約 13,000 の蛋白質が発現しており、また 5×10^5 U/ml の ADF 活性および 5×10^{-5} U/ml のチオレドキシン活性の発現が見られた。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図はヒト ADF cDNA の制限酵素地図である。

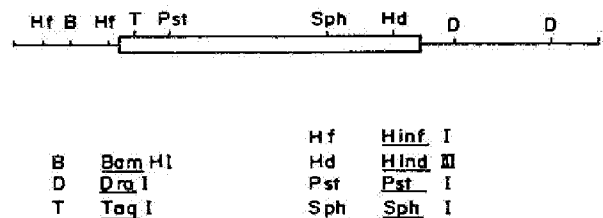
第 2 図はヒト ADF の塩基配列及びアミノ酸配列を示す。

第 3 図はプラスミド pTfADF-1 及び pTfADF-2 の構築図である。

第 4 図はプラスミド pTfADF-2 の HIL-2 cDNA 及びヒト ADF cDNA の接統部分構造を示す。

第 5 図はプラスミド pAM82ADF-1 の構築図である。

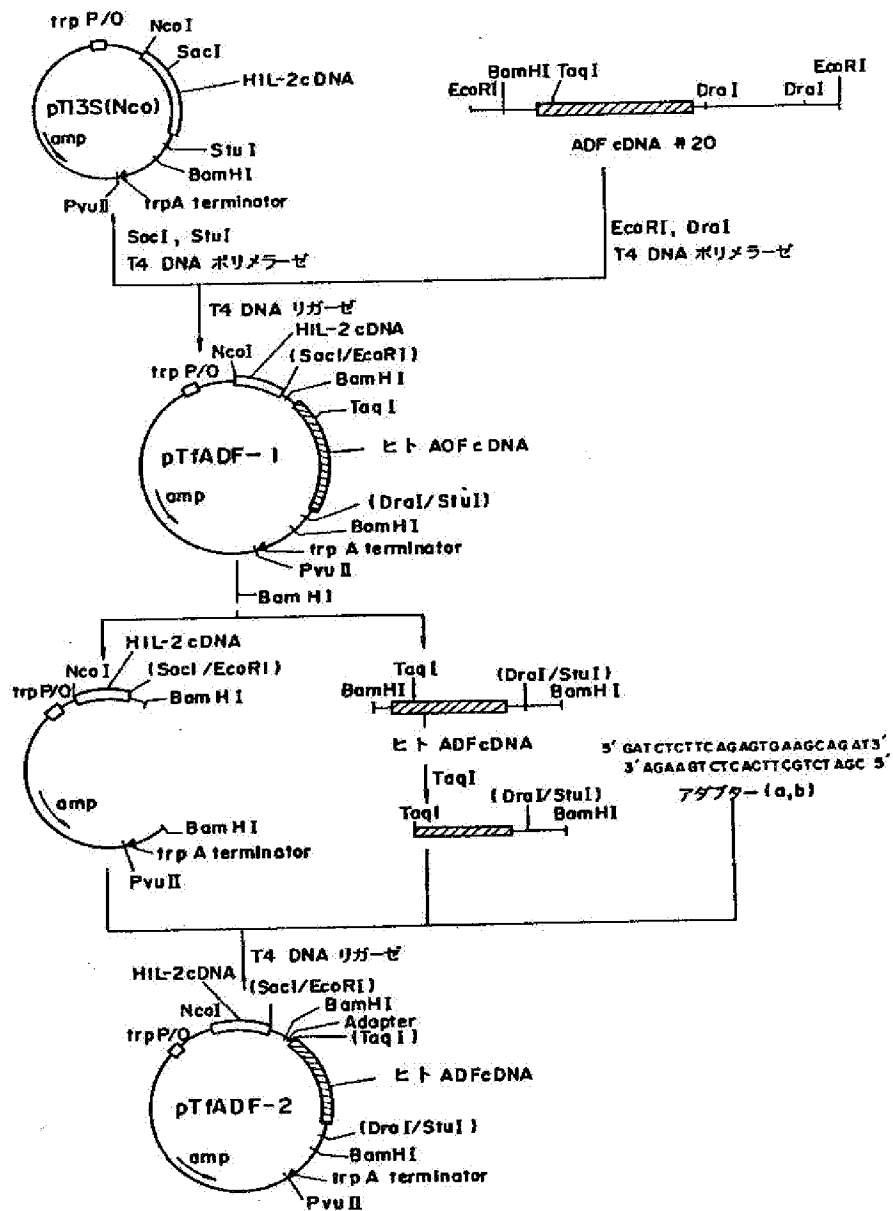
第 6 図はプラスミド pGDADF-1 の構築図である。



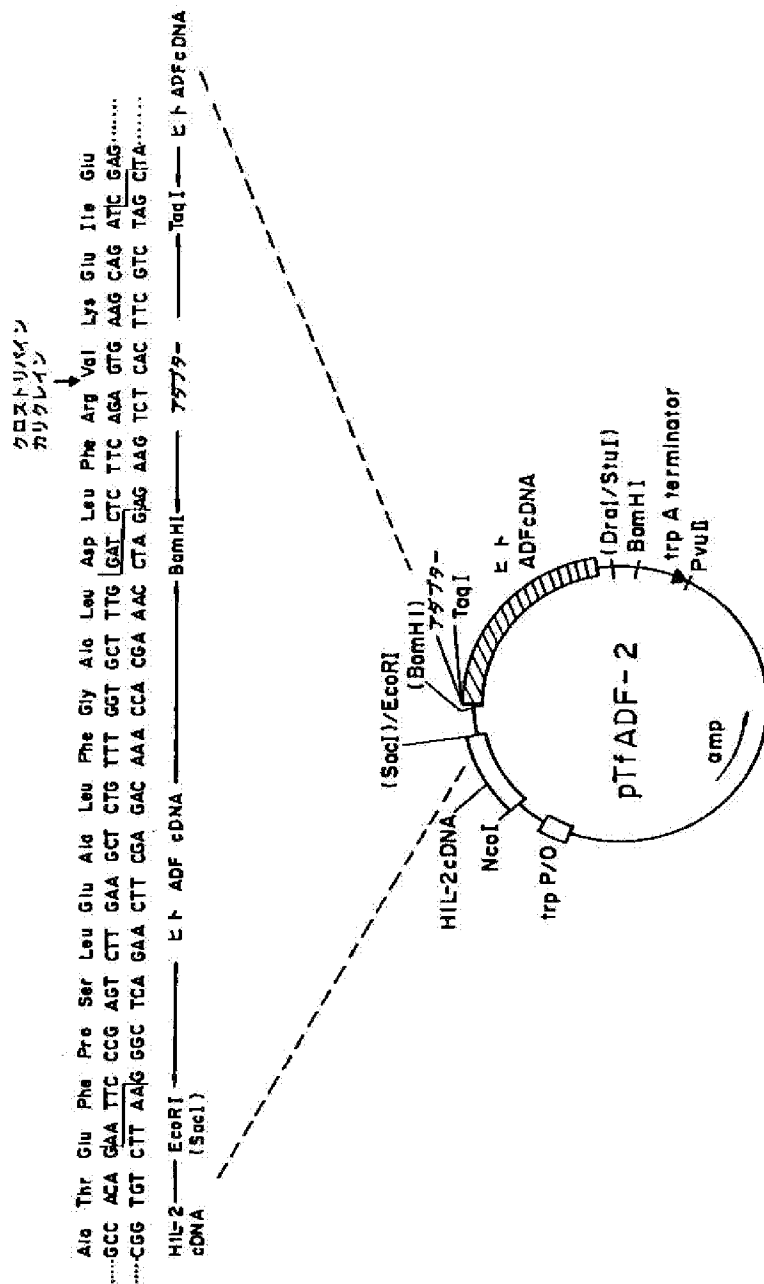
第 1 図

CAG. ACT. CCA. GCA. GCC. AAG. ATG. GTG. AAG. CAG. ATC. GAG. AGC. AAG. ACT. GCT. TTT. CAG. GAA. GCC
 Met-Val-Lys-Gln-Ile-Glu-Ser-Lys-Thr-Ala-Phe-Gln-Glu-Ala
 TTG. GAC. GCT. GCA. GGT. GAT. AAA. CTT. GTA. GTA. GTT. GAC. TTC. TCA. GCC. ACG. TGG. TGT. GGG. CCT
 Leu-Asp-Ala-Ala-Gly-Asp-Lys-Leu-Val-Val-Asp-Phe-Ser-Ala-Thr-Trp-Cys-Gly-Pro
 TGC. AAA. ATG. ATC. AAG. CCT. TTC. TTT. CAT. TCC. CTC. TCT. GAA. AAG. TAT. TCC. AAC. GTG. ATA. TTC
 Cys-Lys-Met-Ile-Lys-Pro-Phe-Phe-His-Ser-Leu-Ser-Glu-Lys-Tyr-Ser-Asn-Val-Ile-Phe
 CTT. GAA. GTA. GAT. GTG. GAT. GAC. TCT. CAG. GAT. GTT. GCT. TCA. GAG. TGT. GAA. GTC. AAA. TGC. ATG
 Leu-Glu-Val-Asp-Val-Asp-Val-Asp-Gln-Asp-Val-Ala-Ser-Glu-Cys-Glu-Val-Lys-Cys-Met
 CCA. ACA. TTC. CAG. TTT. TTT. AAG. AAG. GCA. CAA. AAG. GTG. GGT. GAA. TTT. TCT. GGA. GCC. AAT. AAG
 Pro-Thr-Phe-Gln-Phe-Phe-Lys-Lys-Gly-Gln-Lys-Val-Gly-Glu-Phe-Ser-Gly-Ala-Asn-Lys
 GAA. AAG. CTT. GAA. GCC. ACC. ATT. AAT. GAA. TTA. GTC. TAA. TCA. TGT. TFC. TGA. AAA. TAT. AAC. CAG
 Glu-Lys-Leu-Glu-Ala-Thr-Ile-Asn-Glu-Leu-Val-***
 CCA. TTG. AGC. TAT. TTA. AAA. CTT. GTA. ATT. TTT. TTA. ATT. TAC. AAA. AAT. ATA. AAA. TAT. GAA. GAC
 ATA. AAC. CCA. GTT. GCC. ATC. TGC. GIG. ACA. ATA. AAA. CAT. TAA. TGC. TAA. CAC. TTT. TTA. AAA. CCG.
 TCT. CAT. GTC. TGA. ATA. GCT. TTC. AAA. ATA. AAT. GTG. AAA. TGG. TC

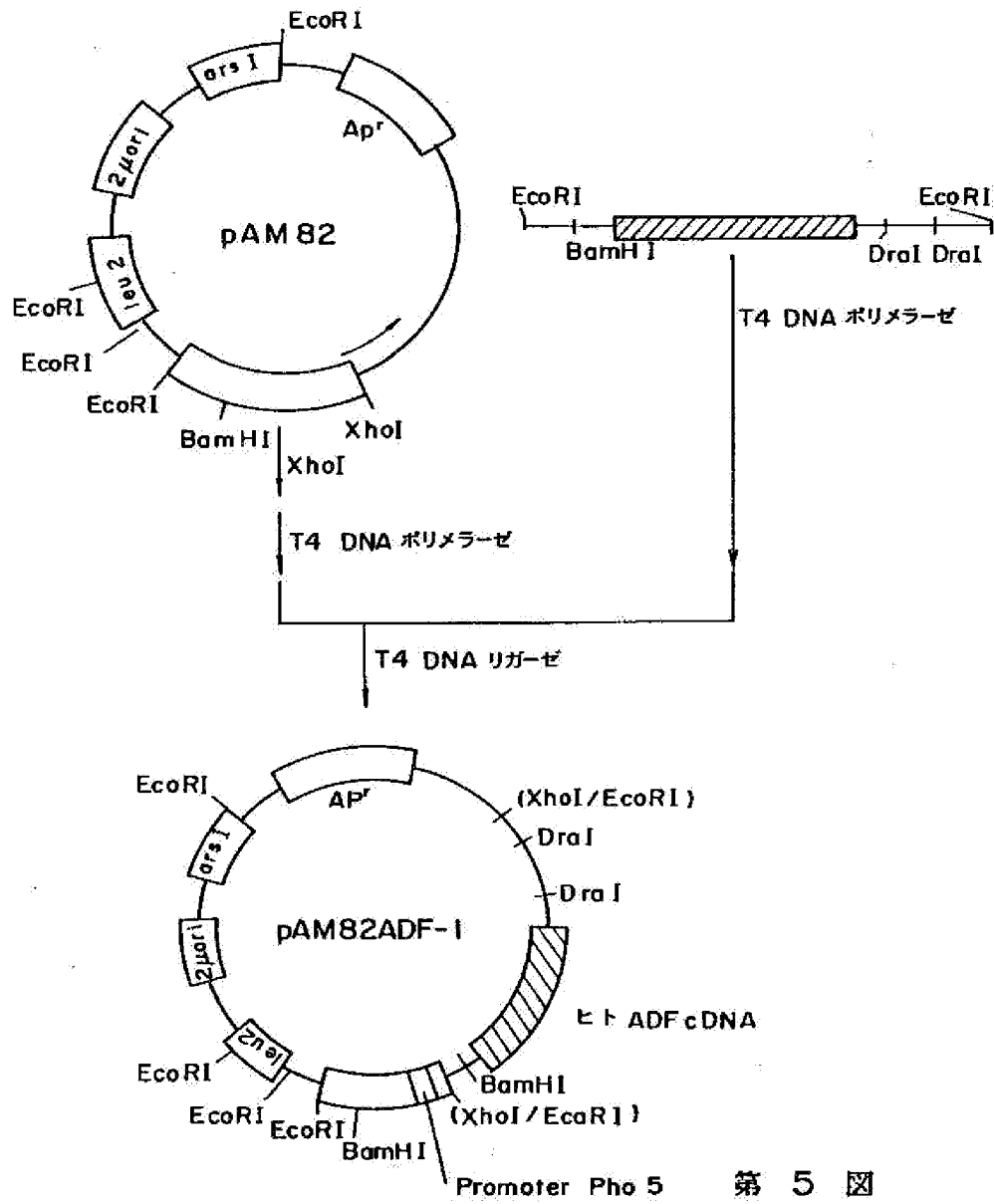
第 2 図



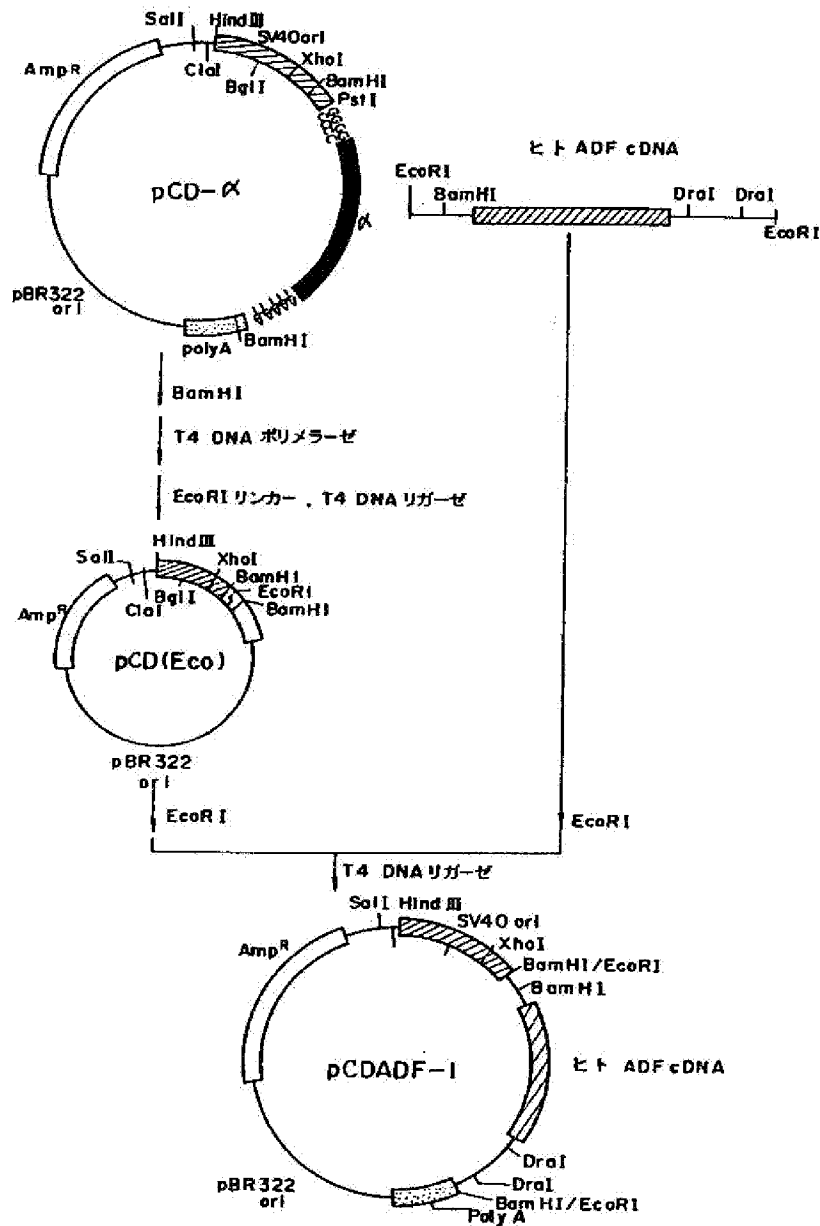
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 6 図

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 4

C 12 N 1/20
5/00

// A 61 K 15/00
37/02

(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:865)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

識別記号

ABD
ADU

庁内整理番号

G-8515-4B
B-8515-4B
A-8412-4B
8615-4C

⑥発 明 者 羽 室 淳 雨 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内